

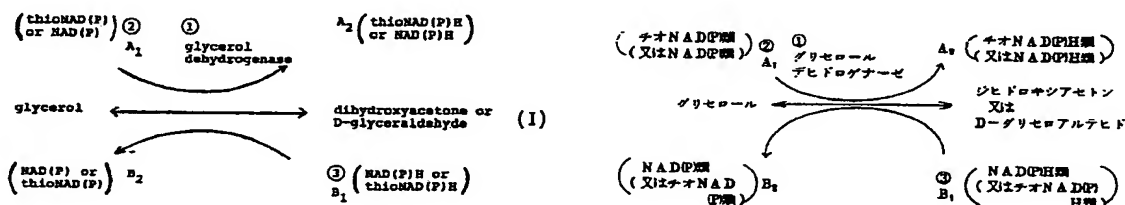


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12Q 1/32	A1	(11) 国際公開番号 WO 92/20818 (43) 国際公開日 1992年11月26日(26. 11. 1992)
(21) 国際出願番号 PCT/JP91/01786 (22) 国際出願日 1991年12月27日(27. 12. 91) (30) 優先権データ 特願平3/110343 1991年5月15日(15. 05. 91) JP (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 東洋醸造株式会社(TOYO JOZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒410-23 静岡県田方郡大仁町三福632番地の1 Shizuoka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 植田 成(UEDA, Shigeru)(JP/JP) 〒410-21 静岡県田方郡菰山町南条1421-237 Shizuoka, (JP) 高橋 守(TAKAHASHI, Mamoru)(JP/JP) 〒411 静岡県駿東郡清水町柿田684-1 Shizuoka, (JP) 美崎英生(MISAKI, Hideo)(JP/JP) 〒410-23 静岡県田方郡大仁町三福839-1 Shizuoka, (JP) (74) 代理人 弁理士 有賀三幸, 外(ARUGA, Mitsuyuki et al.) 〒103 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo, (JP)	(81) 指定国 AT(欧州特許), BE(欧州特許), CH(欧州特許), DE(欧州特許), DK(欧州特許), ES(欧州特許), FR(欧州特許), GB(欧州特許), GR(欧州特許), IT(欧州特許), LU(欧州特許), NL(欧州特許), SE(欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title : HIGH PRECISION DETERMINATION OF GLYCEROL, DIHYDROXYACETONE OR D-GLYCERALDEHYDE AND COMPOSITION THEREFOR

(54) 発明の名称 グリセロール、ジヒドロキシアセトンまたはD-グリセロールアルデヒドの高感度定量法および高感度定量用組成物



(57) Abstract

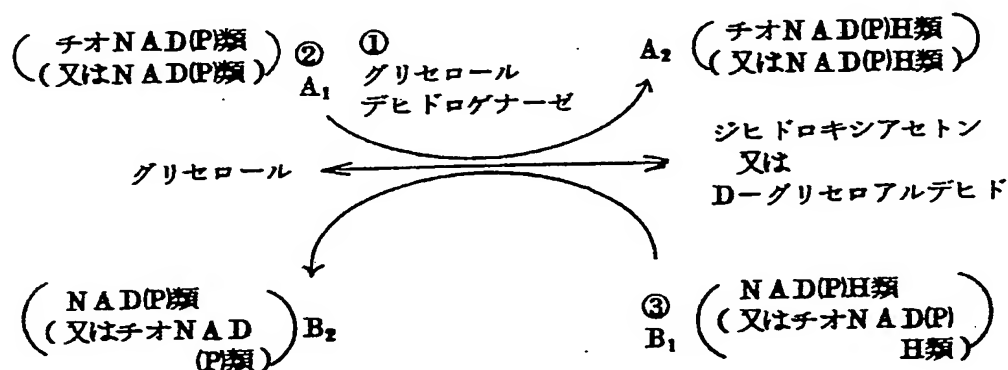
Determination of glycerol, dihydroxyacetone or D-glyceraldehyde by reacting a specimen solution with a reagent containing: (1) glycerol dehydrogenase, (2) A₁, and (3) B₁ to form cycle (I) and determining the amount of A₂ formed or the amount of B₁ consumed; and a composition containing the ingredients (1), (2), and (3) for use in the above determination method. The method and the composition make it possible to determine a small amount of a specimen solution conveniently with high precision and are useful in the field of clinical inspection and food testing.

(57) 要約

被検液に

- ① グリセロールデヒドロゲナーゼ
- ② A_1
- ③ B_1

を含有する試薬を作用させて、次の反応式



で表わされるサイクリング反応を形成させ、 A_2 の生成量又は B_1 の消費量を測定するグリセロール、ジヒドロキシアセトン又はD-グリセロアルデヒドの定量法、及び①、②及び③を含有する上記被検成分の定量用組成物。

この定量法及び組成物を用いれば、少量の被検液で簡便且つ高感度な定量ができ、臨床検査、食品検査等の分野において有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア
AU オーストラリア
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナファソ
BG ブルガリア
BJ バナン
BR ブラジル
CA カナダ
CF 中央アフリカ共和国
CG コンゴ
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CS チェコスロバキア
DE ドイツ
DK デンマーク
ES スペイン

FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GN ギニア
GB イギリス
GR ギリシャ
HU ハンガリー
IE アイルランド
IT イタリア
JP 日本
KP 朝鮮民主主義人民共和国
KR 大韓民国
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ
LU ルクセンブルグ
MC モナコ
MG マダガスカル
ML マリ

MN モンゴル
MR モリタニア
MW マラウイ
NL オランダ
NO ノルウェー
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア連邦
SD スーダン
SE スウェーデン
SN セネガル
SU ソビエト連邦
TD チャド
TG トーゴ
UA ウクライナ
US 米国

明 細 書

グリセロール、ジヒドロキシアセトンまたはD-グリセロアルデヒドの高感度定量法および高感度定量用組成物

技術分野

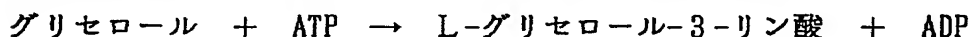
本発明は、臨床検査、食品検査等の分野において重要なグリセロール、ジヒドロキシアセトンまたはD-グリセロール、あるいはこれらを反応生成物とする物質の高感度定量法および定量用組成物に関する。

背景技術

一般に、グリセロールやグリセロールのグリセロールデヒドロゲナーゼによる代謝産物であるジヒドロキシアセトンやD-グリセロアルデヒドを測定することは臨床検査や食品化学の上で極めて重要である。

従来、生体成分や食品成分に含まれるグリセロールの酵素学的測定法は、主に次の(1)グリセロールキナーゼを用いる方法、(2)グリセロールデヒドロゲナーゼを用いる方法、及び(3)グリセロールオキシダーゼを用いる方法に大別される。

(1)の方法は、グリセロールキナーゼにより、次の反応式で示される



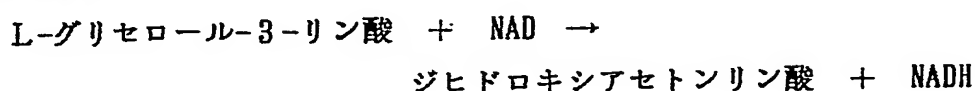
なる反応を進行せしめ、グリセロールと化学量論的に同量のL-グリセロール-3-リン酸またはADPを測定するものである。この方法は測定法によって、更に以下の(a)、(b)、(c)の3種類の方法に分けられる。

(a)上記反応により生成したADPを測定するもので、ADPを例えば下記反応式の如くピルビン酸キナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼを用いた反応に付し、NADHの減少を340nmにおいて分光学的に測定するものである。

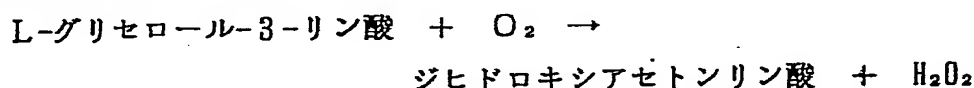


(b)前記反応により生成したL-グリセロール-3-リン酸を測定するもので、L-グリセロール-3-リン酸を下記反応式の如くL-グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼを用いた反応に付し、NADHの増加を340nmにおいて分光学的に測定す

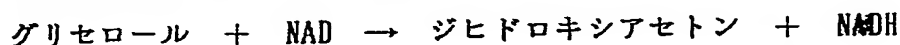
るものである。尚、本方法においては、フェナジンメトサルフェート (PMS) またはジアホラーゼとニトロブルーテトラゾリウムを共存させた比色法を用いる方法も提唱されている。



(c) 上記反応により生成したL-グリセロール-3-リン酸を測定するもので、下記反応式のようにまずL-グリセロール-3-リン酸をL-グリセロール-3-リン酸オキシダーゼを用いた反応に付して過酸化水素を生じせしめ、その後、色原体の共存下にベルオキシダーゼを用いて色素を生じせしめて分光学的に測定するものである (特公平1-31880号公報)。



(2) の方法は、グリセロールデヒドロゲナーゼにより、次の反応式で示される



なる反応を進行せしめ、グリセロールと化学量論的に同量生成するNADHを分光学的に測定するものである (特開平1-117800号公報)。

(3) の方法は、グリセロールオキシダーゼにより、次の反応式で示される



なる反応を進行せしめ、グリセロールと化学量論的に同量生成する過酸化水素を(1) (c)と同様の方法で測定するものである (特開昭53-130488号公報)。

これらの、グリセロールの酵素学的測定法は、臨床検査分野では、脂質代謝異常の診断に有用である血清中トリグリセリドの測定の際に広く用いられている。すなわち、トリグリセリドをリパーゼを用いてグリセロールと脂肪酸に加水分解し、生じたグリセロールを上記いずれかの方法で測定するものである。また、グリセロールの定量は、その他にも様々な生体成分や食品成分の分析にも利用され、例えば、食品分析用試薬として(1) (a)の原理に基づく試薬がキットとして市販さ

れており、ワインやビール中などのグリセロールの測定に利用されている。

また、ジヒドロキシアセトンの測定はグリコーゲン病の診断に有用である。すなわち、ジヒドロキシアセトンを経口投与し、血清中の濃度が増加する場合にはグリコーゲン病の疑いがあると診断される。この定量に際しては、ATPの存在下グリセロールキナーゼ (EC 2.7.1.30) とグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.8) を共存させて、NADHの減少を測定することが行なわれている (生化学辞典, P584, 東京化学同人(1989))。

さらに、D-グリセロアルデヒドはD-フルクトース代謝の中間体であり、この定量に際しては、アルコールデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.1 & EC 1.1.1.2) またはアルデヒドデヒドロゲナーゼ (EC 1.2.1.3 & EC 1.2.1.4) を用いたり、あるいはトリオキナーゼ (EC 2.7.1.28) でグリセロアルデヒド-3-リン酸に導いたのち、トリオースリン酸イソメラーゼ (EC 5.3.1.1)、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.8) を共存させて測定することが行なわれている (生化学辞典, P362-363, 東京化学同人(1989))。

一般に、酵素を用いて分析する場合、上記の各方法のように測定をしようとする対象物質を分光学的に検出可能な過酸化水素や還元型NAD(P)等に変換することが多い。しかしながら、過酸化水素はペルオキシダーゼと共役させて呈色反応に導かれるが、この反応はアスコルビン酸やビリルビン等の還元物質やSH基含有物質等により妨害を受けるという欠点がある。また、還元型NAD(P)の検出は前述のように340nmの吸収で測定する場合は還元型NAD(P)の蓄積によって反応の平衡が還元型NAD(P)生成と逆方向にかたよるため、pH管理を厳密に行わなくてはならないという問題を有している。更に、ジアホラーゼ、ニトロブルーテトラゾリウムを用いた呈色反応を利用した測定法も、還元型NAD(P)蓄積による生成物阻害は防ぐことはできるものの、ホルマザン色素は難溶性であるため試験管やチューブへの色素の付着が起りやすく、自動分析装置への応用は困難である。

また現在、分光学的に検出可能な物質を測定する方法としては分光分析機を用いる方法が最も普及しているが、これも感度上に限界があり、測定対象物の含量

が少ない場合は適さないという欠点があった。

そこで、測定対象物の含量が少ない場合や、測定対象物を含む被検体が少量である場合などは、分光分析よりも感度の優れた蛍光分析や発光分析等が用いられている。しかしながら、これらの方法も機器の普及という点から、臨床検査等の汎用検査としては、あまり適したものではなかった。

また、微量の物質を測定するその他の方法としては、当該物質が等量の補酵素などに変換できる場合は、2種類の酵素を用いて補酵素を増幅する、いわゆる酵素サイクリング法が行われている。例えば、NADサイクリング法、CoAサイクリング法、ATPサイクリング法等が用いられているが、これらの方法はいずれも臨床検査等のルーチン分析においては、操作が煩雑すぎるために用いられていないのが現状である。

従って、分光分析機器にも適用が可能なグリセロール、ジヒドロキシアセトンまたはD-グリセロアルデヒドの高感度測定法の開発が望まれていた。

高感度測定法がもたらす利点としては、測定対象物の含量が少ない場合はもとより、測定に必要な検体量を減らすことができるため、例えば血清のように種々の成分を含むものを被検体に用いる場合には、共存物質によるその測定系に及ぼす影響を小さくすることができる。また、ある限られた被検体量で検査できる項目数を増やすことも可能であり、更には検体が入血液である場合などは、採血量を減らすことができるため、被採血者への心理的な負担を軽減することもできる。このように、検出感度を高くすることは、臨床検査においては血液という貴重な検体を用いることや微量成分を測定する必要性から考えて、必然の要求である。

かかる実情において、本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、グリセロールを基質としてジヒドロキシアセトンまたはD-グリセロアルデヒドを生成する酵素反応を実施するに当たり、酵素としてグリセロールデヒドロゲナーゼを使用する反応系において、補酵素として、一方にチオニコチンアミドアデニンジヌクレオチド類（以下チオNAD類という）およびチオニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート類（以下チオNADP類という）からなる群より選ば

れた1つを使用し、他方に、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド類（以下NAD類という）およびニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート類（以下NADP類という）からなる群より選ばれた1つを使用するという、特定の2種類の補酵素を使用するサイクリング反応を見出した。且つこの反応において、チオNAD類およびチオNADP類の還元型の吸収波長は400nm付近であり、NAD類およびNADP類の還元型の吸収波長は340nm付近であって異なる吸収波長域であることから、どちらか一方の補酵素の変化量のみを、いずれか一方の吸収波長における吸光度を測定することによって定量することにより、吸光度の測定に際して他物質の吸収波長の混雑が回避できる酵素サイクリング反応が実施でき、高感度なグリセロール、ジヒドロキシアセトンまたはD-グリセロアルデヒドの定量が可能であることを確認し、本発明を完成するに至った。

発明の開示

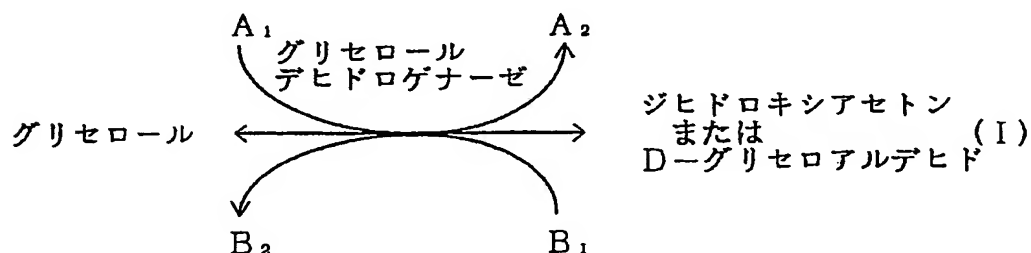
本発明はグリセロール、ジヒドロキシアセトンおよびD-グリセロアルデヒドからなる群より選ばれた1種の被検成分を含有する被検体に、

(1) チオNADP類およびチオNAD類からなる群より選ばれる1つと、NADP類およびNAD類からなる群より選ばれる1つとを補酵素とし、少なくともグリセロールを基質としてジヒドロキシアセトンまたはD-グリセロアルデヒドを生成する可逆反応をなすグリセロールデヒドロゲナーゼ、

(2) A₁

(3) B₁

を含有する試薬を作用せしめて、次の反応式 (I)



(式中、 A_1 はチオNADP類、チオNAD類、NADP類またはNAD類を示し、 A_2 は A_1 の還元型生成物を示し、 B_1 は A_1 がチオNADP類またはチオNAD類のときは還元型NADP類または還元型NAD類を、 A_1 がNADP類またはNAD類のときは還元型チオNADP類または還元型チオNAD類を示し、 B_2 は B_1 の酸化型生成物を示す)

で表されるサイクリング反応を形成せしめ、該反応によって変化する A_2 または B_1 の量を測定することを特徴とするグリセロール、ジヒドロキシアセトンおよびD-グリセロアルデヒドからなる群より選ばれた1種の被検成分の高感度定量法に係るものである。

また、本発明は上記成分(1)、(2)および(3)を含有することを特徴とするグリセロール、ジヒドロキシアセトンおよびD-グリセロアルデヒドからなる群より選ばれた1種の被検成分の高感度定量用組成物に係るものである。

図面の簡単な説明

図1は、実施例1における、グリセロール量に対する400nmにおけるレイトアッセイの結果を示す図面である。図2は、実施例2における、グリセロール量に対する400nmにおけるレイトアッセイの結果を示す図面である。図3は、実施例3における、L- α -ホスファチジル-DL-グリセロール量に対する400nmにおけるレイトアッセイの結果を示す図面である。図4は、実施例4における、ジヒドロキシアセトン量に対する400nmにおけるレイトアッセイの結果を示す図面である。図5は、実施例5における、グリセロール量に対する400nmにおけるレイトアッセイの結果を示す図面である。

発明を実施するための最良の形態

本発明において用いられるグリセロールデヒドロゲナーゼは、少なくともグリセロールを基質としてジヒドロキシアセトンまたはD-グリセロアルデヒドを生成する可逆反応を触媒するものであって、チオNADP類およびチオNAD類からなる群より選ばれた1つと、NADP類およびNAD類からなる群より選ばれた1つとを補酵素とするものならいずれをも用いることができる。

本酵素は、動物組織、植物、バクテリア等に広く存在する。酵素ハンドブック

〔朝倉書店（1983年）〕によれば、グリセロールデヒドロゲナーゼには、酵素番号の異なる3種類の酵素が存在する。そのうちBC 1.1.1.6のものは、(チオ)NAD類に特異的な酵素であり、グリセロールを基質としてジヒドロキシアセトンを生産物とする反応をつかさどり、その具体例としては、大腸菌 (*B. Coli*)、アエロバクター アエロゲネス (*Aerobacter aerogenes*)、アセトバクター サボキシダンス (*Acetobacter suboxydans*) 由来のものや、市販されているものとしてバチルス メガテリウム (*Bacillus megaterium*) (東洋醸造社製)、エンテロバクター アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) (ベーリンガー・マンハイム社製)、セルロモナス エスピー (*Cellulomonas sp.*) (東洋紡社製) 由来のもの等が挙げられる。また、バチルス ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) 由来の耐熱性酵素も知られている (特公平1-17674号公報)。

これらのうち、バチルス メガテリウム (*Bacillus megaterium*) (東洋醸造社製) 由来の酵素の補酵素に対する相対活性は、NAD類を用いたときを100%とすると、チオNAD類で7.6%であり、(チオ)NADP類には作用しなかった。また、セルロモナス エスピー (*Cellulomonas sp.*) (東洋紡社製) 由来の酵素の補酵素に対する相対活性はNAD類を用いたときを100%とすると、チオNAD類で6.4%であり、(チオ)NADP類には作用しなかった。

また、BC 1.1.1.72のものは、(チオ)NADP類に特異的な酵素であり、グリセロールを基質としてD-グリセロアルデヒドを生産物とする反応をつかさどり、ウサギ骨格筋に見出されている。この酵素はpH7では逆反応が支配的であり、NADもNADPの10%の活性を示す (*Biochim. Biophys. Acta* 258, 40-55, 1972)。また、ニューロスポラ クラッサ (*Neurospora crassa*) 由来の酵素についての報告もなされているが (*Journal of General Microbiology*, 107, 289-296, 1978)、この酵素は(チオ)NAD類は補酵素としない。

更に、BC 1.1.1.156のものは、(チオ)NADP類に特異的な酵素であり、グリセロールを基質としてジヒドロキシアセトンを生産物とする反応をつかさどり、緑藻 *ドウナリエラ パルバ* (*Dunaliella parva*) の細胞に見出されている。

本発明においては、基質であるグリセロールに対して反応性を有するものであれば、上述の酵素以外の他の起源の酵素も使用することができ、その補酵素に対する特異性は適宜、補酵素と基質とを用いて確認することができる。

また、本発明において、A₁およびB₂の補酵素はチオNADP類、チオNAD類、NADP類、NAD類を示すが、このうちチオNADP類またはチオNAD類としては、例えばチオニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート（チオNADP）、チオニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチドホスフェート、チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（チオNAD）、チオニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチドが挙げられる。また、NADP類またはNAD類としては、例えばニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート（NADP）、アセチルピリジンアデニンジヌクレオチドホスフェート（アセチルNADP）、アセチルピリジンヒポキサンチンジヌクレオチドホスフェート、ニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチドホスフェート（デアミノNADP）、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）、アセチルピリジンアデニンジヌクレオチド（アセチルNAD）、アセチルピリジンヒポキサンチンジヌクレオチド、ニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチド（デアミノNAD）が挙げられる。尚これら補酵素の還元型は、各々チオNADPH類、チオNADH類、NADPH類、NADH類として表示する。

本発明においてはA₁およびB₁において例えばA₁がチオNAD(P)類である場合、B₁はNAD(P)H類であることが必要であり、A₁がNAD(P)類である場合、B₁はチオNAD(P)H類であることが必要である。

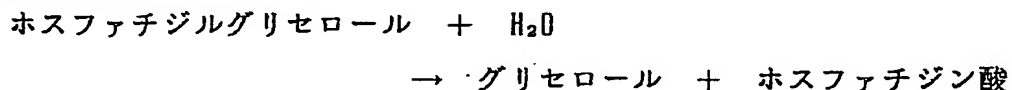
また定量に用いるグリセロールデヒドロゲナーゼが(チオ)NAD類のみを補酵素とする場合は、上述のチオNAD類とNAD類より、また、用いるグリセロールデヒドロゲナーゼが(チオ)NADP類のみを補酵素とする場合は、上述のチオNADP類およびNADP類より、更に用いるグリセロールデヒドロゲナーゼが(チオ)NAD類および(チオ)NADP類を共に補酵素にする場合は上述のチオNAD類およびチオNADP類と上述のNAD類およびNADP類より適宜選択し、それらの酸化型、還元型を適宜用いればよい。

本発明の高感度定量法を用いて測定を行う場合には、酵素サイクリング反応が最も効率よく進行するように、使用するグリセロールデヒドロゲナーゼの各補酵素間の相対活性を考慮して2種の補酵素の選択と使用する比率の設定を行い、更に反応pHを正反応／逆反応の至適pH範囲に設定するのが好ましい。

また、本発明の定量法によれば被検体中のグリセロールの定量のみならず、グリセロールにグリセロールデヒドロゲナーゼを反応させた場合の反応生成物であるジヒドロキシアセトンまたはD-グリセロアルデヒドの定量も可能である。

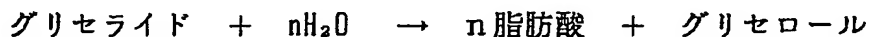
また、本発明の高感度定量法を用いれば、グリセロール、ジヒドロキシアセトンまたはD-グリセロアルデヒドを遊離、生成する酵素系における基質やその酵素活性を測定することもできる。更に、本発明の高感度定量法を用いれば、上記のようなグリセロール、ジヒドロキシアセトンまたはD-グリセロアルデヒドを遊離、生成する酵素系と連結し得る単一の、もしくは複数の工程からなる酵素系における基質やその酵素活性をも測定することができる。これらの酵素系は、特に限定されるものではないが、例えば以下に示す種々の反応系が挙げられる。

(1) ホスファチジルグリセロールとホスホリパーゼD (BC 3.1.4.4)の酵素反応系。



この系において、遊離、生成するグリセロールを定量することにより、ホスファチジルグリセロールの定量またはホスホリパーゼDの活性測定をすることができる。

(2) モノ、ジまたはトリグリセライドとリパーゼ (BC 3.1.1.3)の酵素反応系。



この系において、遊離、生成するグリセロールを定量することにより、モノ、ジまたはトリグリセライドの定量あるいはリパーゼの活性測定をすることができる。

(3) D-フルクトース-1-リン酸とフルクトースジリン酸アルドラーゼ (BC 4.1.2.13) の酵素反応系。

D-フルクトース-1-リン酸

→ ジヒドロキシアセトンリン酸 + D-グリセロアルデヒド

この系において、遊離、生成するD-グリセロアルデヒドを定量することにより、D-フルクトース-1-リン酸の定量またはフルクトースジリン酸アルドラーゼの活性測定をすることができる。

(4) (3) のD-フルクトース-1-リン酸がD-フルクトース、ATPとヘキソキナーゼ (BC 2.7.1.3) の酵素反応系由来である場合。

D-フルクトース + ATP → D-フルクトース-1-リン酸 + ADP

D-フルクトース-1-リン酸 →

ジヒドロキシアセトンリン酸 + D-グリセロアルデヒド

この場合、最終的に生成するD-グリセロアルデヒドを定量することにより、D-フルクトースの定量またはヘキソキナーゼの活性測定をすることができる。

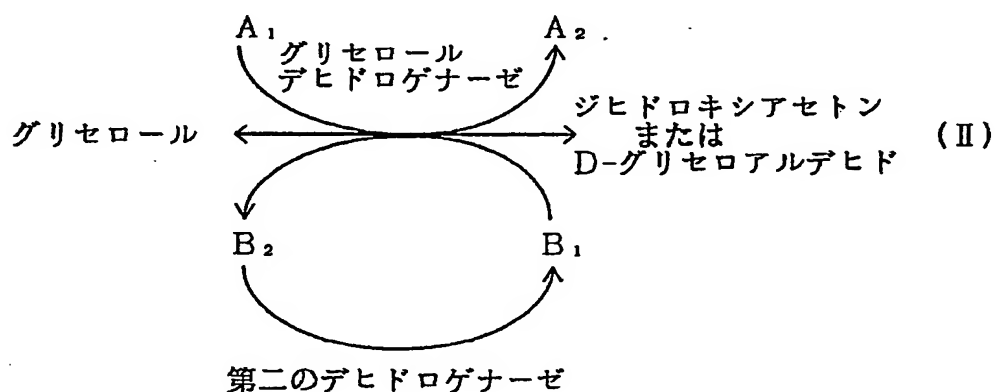
本発明における、A₁およびB₁の使用量は被検体中のグリセロール、ジヒドロキシアセトンおよびD-グリセロアルデヒドからなる群より選ばれた1種の被検成分に比較して過剰量であること、且つグリセロールデヒドロゲナーゼのA₁およびB₁それぞれに対するK_m値に比較して過剰量であることが必要であり、特に被検成分の20~10000倍モルが好ましい。

本発明の定量用組成物においては、A₁およびB₁の濃度は0.02~100mM、特に0.05~20mMが好ましく、グリセロールデヒドロゲナーゼの量は10~1000u/ml、特に25~400u/mlが好ましいが、その量は被検体の種類等により適宜決定することができ、これ以上の量を用いることもできる。

また、本発明定量法はグリセロールデヒドロゲナーゼが単独でまたは2種以上の組み合わせによって(チオ)NAD類および(チオ)NADP類を共に補酵素とする場合において、2つの補酵素にチオNAD類とNAD類もしくはNADP類との組合せ、またはチオNADP類とNAD類もしくはNADP類との組合せを選んだときには、更に被検体に

成分(4)のグリセロールに作用せず、 $B_2 \rightarrow B_1$ の反応を形成する第二のデヒドロゲナーゼおよび該第二のデヒドロゲナーゼの基質を作用せしめることにより、後記反応式(Ⅱ)のごとく、 B_1 と B_2 の間に B_1 の再生のための反応系を付与することにより当該サイクリング反応を形成せしめ得る。

この場合、第二のデヒドロゲナーゼは、この測定系において実質的に A_1 に作用しないものであるか、あるいは実質的に A_1 に作用し得ない条件を設定することが好ましく、例えば A_1 を本質的に補酵素として利用しない第二のデヒドロゲナーゼを選択する組合せ、 A_1 と B_2 の量的関係により第二のデヒドロゲナーゼが実質的に A_1 に作用しない条件を選択する組合せ等が例示される。定量の際には反応により生成した A_2 の量を測定する。



(式中、 A_1 はチオNADP類、チオNAD類、NADP類またはNAD類を示し、 A_2 は A_1 の還元型生成物を示し、 B_1 は A_1 がチオNADP類またはチオNAD類のときは還元型NADP類または還元型NAD類を、 A_1 がNADP類またはNAD類のときは還元型チオNADP類または還元型チオNAD類を示し、 B_2 は B_1 の酸化型生成物を示し、 $B_2 \rightarrow B_1$ は B_2 を補酵素として B_1 を生成する酵素反応を示す)

上記の成分(4)を用いる定量用組成物において、 A_1 の濃度は0.02~100mM、特に0.05~20mMが好ましく、 B_2 または/および B_1 の濃度は0.05~5000 μ M、特に5~500 μ Mが好ましく、グリセロールデヒドロゲナーゼの濃度は5~1000u/ml、

特に25~500u/mlが好ましく、第二のデヒドロゲナーゼはB₂に対するKm値 (mM単位) の20倍量 (u/ml単位) 以上になるように調整すればよく、例えば1~100u/mlが好ましく、また第二のデヒドロゲナーゼの基質は過剰量、例えば0.05~20mMが好ましい。これらの量は被検体の種類等により適宜決定することができ、これ以上の量を用いることもできる。

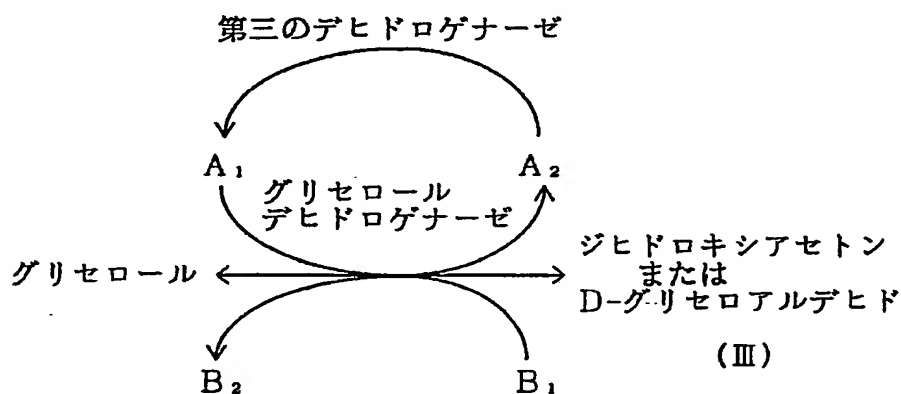
第二のデヒドロゲナーゼはB₁の再生のために補助的に添加するものであり、これによってB₁の使用量を少なくすることが可能となり、特にB₁が高価な場合は有効である。また、B₁の代わりにB₂あるいはB₁とB₂の混合物を用いて反応を行ってもよい。この場合、B₁または/およびB₂の使用量は特に限定されるものではないが、一般的にはA₁の1/10モル以下が好ましい。

第二のデヒドロゲナーゼおよびその基質としては、例えば、B₂がNAD類またはチオNAD類のときは、アルコールデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.1) とエタノール、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.8) (ウサギ筋肉由来) とL-グリセロール-3-リン酸、グリセロアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.12) (ウサギ骨格筋、肝、酵母、B. Coli由来) とD-グリセロアルデヒドリン酸とリン酸、B₂がNADP類またはチオNADP類のときは、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.49) (酵母由来) とグルコース-6-リン酸、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.42) (酵母、ブタ心筋由来) とイソクエン酸、グリオキシル酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.2.1.17) (Pseudomonas oxalaticus由来) とCoAとグリオキシル酸、ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.44) (ラット肝、ビール酵母、B. Coli由来) と6-ホスホ-D-グルコン酸、グリセロアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.2.1.13) (植物葉緑体由来) とD-グリセロアルデヒド-3-リン酸とリン酸、ベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼ (EC 1.2.1.7) (Pseudomonas fluorescens由来) とベンズアルデヒド等が挙げられる。

更にまた、本発明定量法はグリセロールデヒドロゲナーゼが単独であるいは2種以上の組み合わせによって(チオ)NAD類および(チオ)NADP類を共に補酵素とする場合において、2つの補酵素にチオNAD類とNAD類もしくはNADP類との組合せ、

またはチオNADP類とNAD類もしくはNADP類との組合せを選んだときには、更に被検体に成分(5)のグリセロールに作用せず、 $A_2 \rightarrow A_1$ の反応を形成する第三のデヒドロゲナーゼおよび該第三のデヒドロゲナーゼの基質を作用せしめる事により、後記反応式(Ⅲ)のごとく、 A_1 と A_2 の間に A_1 の再生の為の反応系を付与することにより当該サイクリング反応を形成し得る。

この場合、第三のデヒドロゲナーゼは、この測定系において実質的に B_1 に作用し得ないものであるか、あるいは実質的に B_1 に作用し得ない条件を設定することが好ましく、例えば B_1 を本質的に補酵素として利用しない酵素を選択する組合せ、 B_1 と A_2 の量的関係により第三のデヒドロゲナーゼが実質的に B_1 に作用しない条件を選択する組合せ等が例示される。定量の際には B_1 の消費量を測定する。



(式中、 A_1 はチオNADP類、チオNAD類、NADP類またはNAD類を示し、 A_2 は A_1 の還元型生成物を示し、 B_1 は A_1 がチオNADP類またはチオNAD類のときは還元型NADP類または還元型NAD類を、 A_1 がNADP類またはNAD類のときは還元型チオNADP類または還元型チオNAD類を示し、 B_2 は B_1 の酸化型生成物を示し、 $A_2 \rightarrow A_1$ は A_2 を補酵素として A_1 を生成する酵素反応を示す)

この成分(5)を用いる定量用組成物において、 B_1 の濃度は0.02~100mM、特に0.05~20mMが好ましく、 A_2 または/および A_1 の濃度は0.05~5000 μ M、特に5~500 μ Mが好ましく、グリセロールデヒドロゲナーゼの濃度は10~1000u/ml、特

に25~500u/mlが好ましく、第三のデヒドロゲナーゼはA₂に対するKm値 (mM単位) の20倍量 (u/ml単位) 以上になるように調整すればよく、例えば1~100u/mlが好ましく、また第三のデヒドロゲナーゼの基質は過剰量、例えば0.05~20mMが好ましい。これらの量は被検体の種類等により適宜決定することができ、これ以上の量を用いることもできる。

第三のデヒドロゲナーゼはA₁の再生の為に補助的に添加するものであり、これによってA₁の使用量を少なくすることが可能となり、特にA₁が高価な場合には有効である。また、A₁の代わりにA₂あるいはA₁とA₂の混合物を用いて反応を行ってもよい。この場合、A₁または/およびA₂の使用量は特に限定されるものではないが、一般的にはB₁の1/10モル以下が好ましい。

第三のデヒドロゲナーゼおよびその基質としては、例えば、A₁がNAD類またはチオNAD類のときは、アルコールデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.1) とアセトアルデヒド、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.8) (ウサギ筋肉由来) とジヒドロキシアセトンリン酸、グリセロアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.12) (ウサギ骨格筋、肝、酵母、E. Coli由来) と1,3-ジホスホ-D-グリセリン酸、A₁がNADP類またはチオNADP類のときは、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.49) (酵母由来) とグルコノラクトン-6-リン酸、グリセロアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.2.1.13) (植物葉緑体由来) と1,3-ジホスホ-D-グリセリン酸等が挙げられる。

かくして調製された本発明の定量用組成物によって被検体中のグリセロール、ジヒドロキシアセトンまたはD-グリセロアルデヒドを測定するには、上記成分 (1)~(3)、(1)~(4)、あるいは(1)~(3)および(5)を含有する組成物に被検体 0.001~0.5mlを加え、約37℃の温度にて反応させ、反応開始一定時間後の2点間の数分ないし数十分間、例えば2分後と5分後の3分間、または2分後と7分後の5分間における生成されたA₂の量または消費されたB₁の量を、それぞれの吸収波長に基づく吸光度の変化によって測定すればよい。例えば、A₂がチオNADH、B₁がNADHの場合、A₂の生成を400nm付近の吸光度の増加により測定するか、あ

るいはB₁の消費を340nm付近の吸光度の減少により測定し、既知濃度のグリセロール、ジヒドロキシアセトンまたはD-グリセロアルデヒドを用いて測定したときの値と比較すれば、被検液中のそれぞれの量をリアルタイムで求めることができる。

また、本発明定量法は、被検液中のグリセロール、ジヒドロキシアセトンまたはD-グリセロアルデヒドそのものを酵素サイクリング反応に導くものであり、被検液中の共存物質の影響を受けにくいため、被検液のブランク測定を省略することができ、レイトアッセイによる簡便な測定を成し得る。

尚、本発明においてはA₂またはB₁の測定に当たり、吸光度測定代わりに他の公知の測定法を使用して定量を行うこともできる。

実施例

次いで本発明の実施例を挙げて具体的に述べるが、本発明はこれによって何等限定されるものではない。

実施例1 グリセロールの定量

<試薬>

40 mM	グリシンNaOH緩衝液 (pH10.0)
2 mM	チオNAD (シグマ社製)
0.2 mM	還元型NAD (オリエンタル酵母工業(株)製)
2 mM	BDTA
100 mM	塩化アンモニウム
168 u/ml	グリセロールデヒドロゲナーゼ (東洋紡社製: セルロモナス エスピー (Cellulomonas sp.) 由来)

<操作>

上記試薬1mlをキュベットにとり、0、20、40、60、80、100μMのグリセロール溶液をそれぞれ20μl添加し、37℃にて反応を開始させた。反応開始後2分目と5分目の400nmにおける吸光度を読み取りその差を求めた。濃度0の値を試薬ブランクとし、20~100μMのそれぞれのグリセロールの値からこの値を引き、そ

の結果を図1に示した。図1から明らかなように、グリセロール量に対する吸光度変化量は良好な直線性を示した。

実施例2 グリセロールの定量

〈試薬〉

50 mM	トリス塩酸緩衝液 (pH8.5)
2 mM	チオNAD (シグマ社製)
0.1 mM	還元型NAD (オリエンタル酵母工業(株)製)
200 mM	塩化カリウム
168 u/ml	グリセロールデヒドロゲナーゼ (東洋醸造社製：バチルス メガテリウム (Bacillus megaterium) 由来)

〈操作〉

上記試薬1mlをキューベットにとり、0、2、4、6、8、10 μ Mのグリセロール溶液をそれぞれ50 μ l添加し、37℃にて反応を開始させた。反応開始後2分目と5分目の400nmにおける吸光度を読み取りその差を求めた。実施例1と同様試薬ブランクとの差を求め、その結果を図2に示した。図2から明らかなように、グリセロール量に対する吸光度変化量は良好な直線性を示した。

実施例3 L- α -ホスファチジル-DL-グリセロールの定量

〈試薬〉

50 mM	トリス塩酸緩衝液 (pH8.9)
1 mM	塩化カルシウム
2 mM	チオNAD (シグマ社製)
0.1 mM	還元型NAD (オリエンタル酵母工業(株)製)
200 mM	塩化カリウム
2 u/ml	ホスホリパーゼD (東洋醸造社製：ストレプトマイセス クロモフスカス (Streptomyces chromofuscus) 由来)
120 u/ml	グリセロールデヒドロゲナーゼ (東洋醸造社製：バチルス メガテリウム (Bacillus megaterium) 由来)

<操作>

10mg/mlのL- α -ホスファチジル-DL-グリセロール溶液（クロロホルム：メタノール=98：2（シグマ社））をエバポレーターにて蒸発乾固し、2500倍容の0.5%トリトンX-100（シグマ社）溶液を用いて溶解させた（4.0 μ g/ml）。このものを水で希釈し、8、16、24、32、40 μ g/mlのL- α -ホスファチジル-DL-グリセロール溶液を調製した。

上記試薬1mlをキュベットにとり、8、16、24、32、40 μ g/mlのL- α -ホスファチジル-DL-グリセロール溶液をそれぞれ50 μ l添加し、37℃にて反応を開始させた。反応開始後2分目と7分目の400nmにおける吸光度を読み取りその差を求めた。実施例1と同様試薬ブランクとの差を求め、その結果を図3に示した。図3から明らかなように、L- α -ホスファチジル-DL-グリセロール量に対する吸光度変化量は良好な直線性を示した。

実施例4 ジヒドロキシアセトンの定量

<試薬>

40 mM	グリシンNaOH緩衝液(pH10.0)
2 mM	チオNAD（シグマ社製）
0.2 mM	還元型NAD（オリエンタル酵母工業(株)製）
2 mM	BDTA
100 mM	塩化アンモニウム
168 u/ml	グリセロールデヒドロゲナーゼ（東洋紡社製：セルロモナス エスピー（Cellulomonas sp.）由来）

<操作>

上記試薬1mlをキュベットにとり、0、20、40、60、80、100 μ Mのジヒドロキシアセトン溶液をそれぞれ20 μ l添加し、37℃にて反応を開始させた。反応開始後2分目と5分目の400nmにおける吸光度を読み取りその差を求めた。実施例1と同様試薬ブランクとの差を求め、その結果を図4に示した。図4から明らかなように、ジヒドロキシアセトン量に対する吸光度変化量は良好な直線性を示した。

実施例5 グリセロールの定量

〈試薬〉

- 50 mM リン酸緩衝液 (pH7.5)
- 5 mM チオNADP (シグマ社製)
- 0.1 mM 還元型NADP (オリエンタル酵母工業(株)製)
- 54 u/ml グリセロールデヒドロゲナーゼ (ウサギ骨格筋由来)

〈操作〉

ウサギ骨格筋より、Biochim. Biophys. Acta, 258, 40-55 (1972) に準じてNADPに特異的なグリセロールデヒドロゲナーゼを精製し、使用に供した。

上記試薬1mlをキュベットにとり、0、20、40、60、80、100 μ Mのグリセロール溶液をそれぞれ40 μ l添加し、37℃にて反応を開始させた。反応開始後2分目と7分目の400nmにおける吸光度を読み取りその差を求めた。実施例1と同様試薬ブランクとの差を求め、その結果を図5に示した。図5から明らかなように、グリセロール量に対する吸光度変化量は良好な直線性を示した。

産業上の利用可能性

上述のごとく、本発明は還元型の吸収波長の異なる補酵素を用いるため測定誤差が生じず、また、酵素サイクリング反応を組み合わせることによって感度を増大させることができるため、少量の検体で迅速かつ正確に被検体中のグリセロール、ジヒドロキシアセトンまたはD-グリセロアルデヒドを定量することができる。

請求の範囲

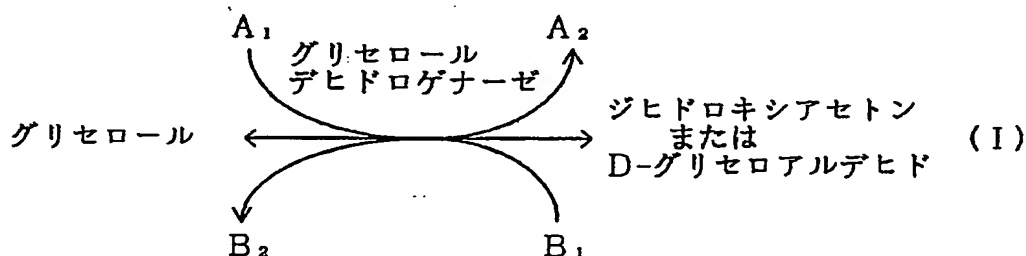
1. グリセロール、ジヒドロキシアセトンおよびD-グリセロアルデヒドからなる群より選ばれた1種の被検成分を含有する被検体に、

(1) チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート類（以下チオNADP類という）およびチオニコチンアミドアデニンジヌクレオチド類（以下チオNAD類という）からなる群より選ばれる1つと、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート類（以下NADP類という）およびニコチンアミドアデニンジヌクレオチド類（以下NAD類という）からなる群より選ばれる1つとを補酵素とし、少なくともグリセロールを基質としてジヒドロキシアセトンまたはD-グリセロアルデヒドを生成する可逆反応をなすグリセロールデヒドロゲナーゼ、

(2) A_1

(3) B_1

を含有する試薬を作用せしめて、次の反応式 (I)



(式中、 A_1 はチオNADP類、チオNAD類、NADP類またはNAD類を示し、 A_2 は A_1 の還元型生成物を示し、 B_1 は A_1 がチオNADP類またはチオNAD類のときは還元型NADP類または還元型NAD類を、 A_1 がNADP類またはNAD類のときは還元型チオNADP類または還元型チオNAD類を示し、 B_2 は B_1 の酸化型生成物を示す)

で表わされるサイクリング反応を形成せしめ、該反応によって変化する A_2 または B_1 の量を測定することの特徴とするグリセロール、ジヒドロキシアセトンおよびD-グリセロアルデヒドからなる群より選ばれた1種の被検成分の高感度定量法。

2. NADP類が、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート (NADP)、アセチルピリジンアデニンジヌクレオチドホスフェート (アセチルNADP)、アセチルピリジンヒポキサンチンジヌクレオチドホスフェートおよびニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチドホスフェート (デアミノNADP) からなる群より選ばれたものである請求項1記載の高感度定量法。
3. NAD類が、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD)、アセチルピリジンアデニンジヌクレオチド (アセチルNAD)、アセチルピリジンヒポキサンチンジヌクレオチドおよびニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチド (デアミノNAD) からなる群より選ばれたものである請求項1記載の高感度定量法。
4. チオNADP類が、チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート (チオNADP) およびチオニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチドホスフェートからなる群より選ばれたものである請求項1記載の高感度定量法。
5. チオNAD類が、チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (チオNAD) およびチオニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチドからなる群より選ばれたものである請求項1記載の高感度定量法。
6. 次の成分 (1) ~ (3)
 - (1) NADP類およびチオNAD類からなる群より選ばれる1つと、NADP類およびNAD類からなる群より選ばれる1つとを補酵素とし、少なくともグリセロールを基質としてジヒドロキシアセトンまたはD-グリセロアルデヒドを生成する可逆反応をなすグリセロールデヒドロゲナーゼ、
 - (2) A₁
 - (3) B₁(A₁はチオNADP類、チオNAD類、NADP類またはNAD類を示し、B₁はA₁がチオNADP類またはチオNAD類のときは還元型NADP類または還元型NAD類を、A₁がNADP類またはNAD類のときは還元型チオNADP類または還元型チオNAD類を示す)
を含有することを特徴とするグリセロール、ジヒドロキシアセトンおよびD-グリセロアルデヒドからなる群より選ばれた1種の被検成分の高感度定量用組成物。

図 1

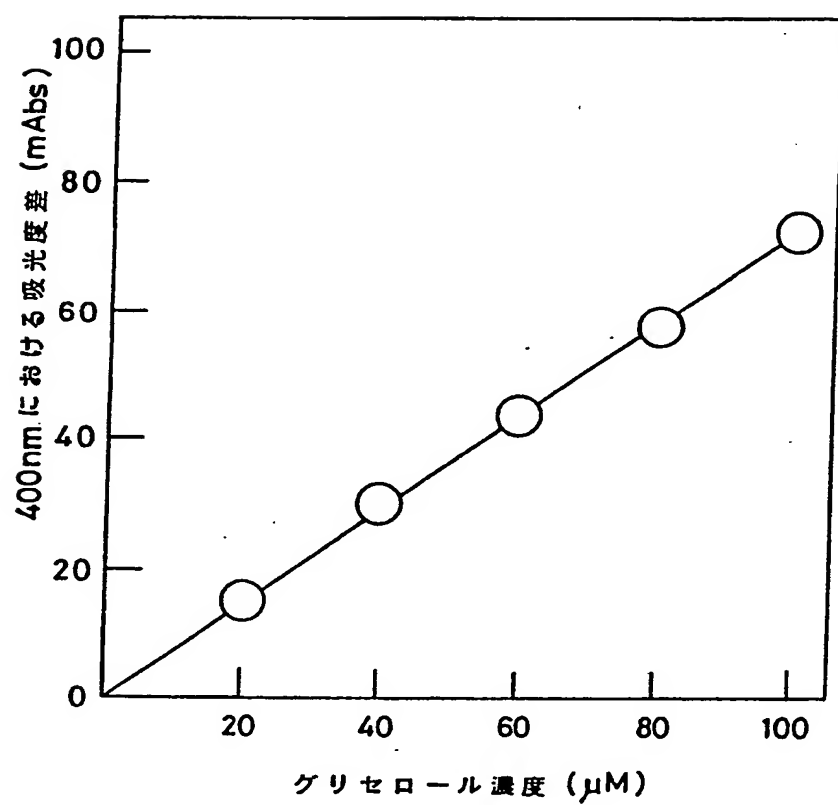


図 2

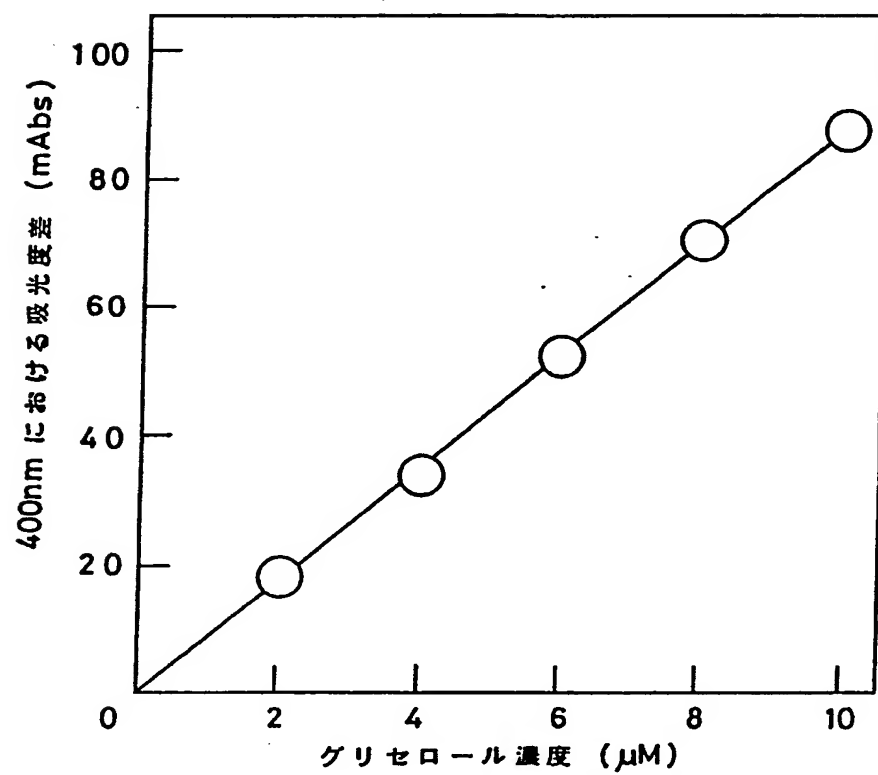


図 3

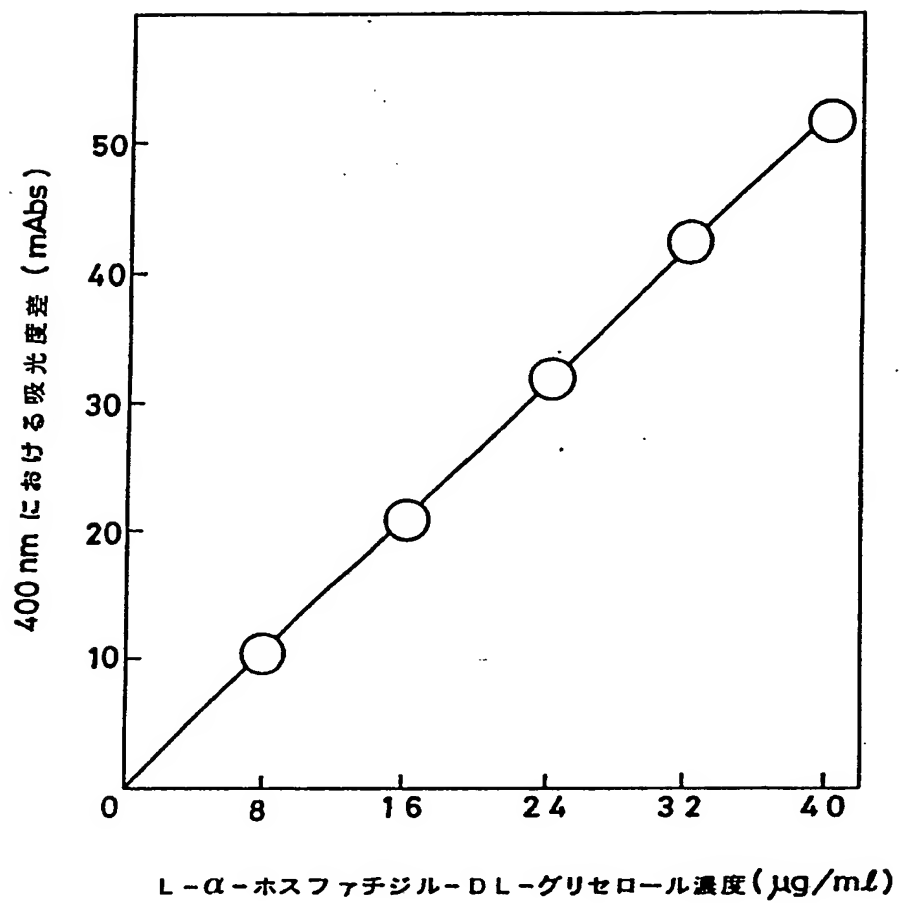


図 4

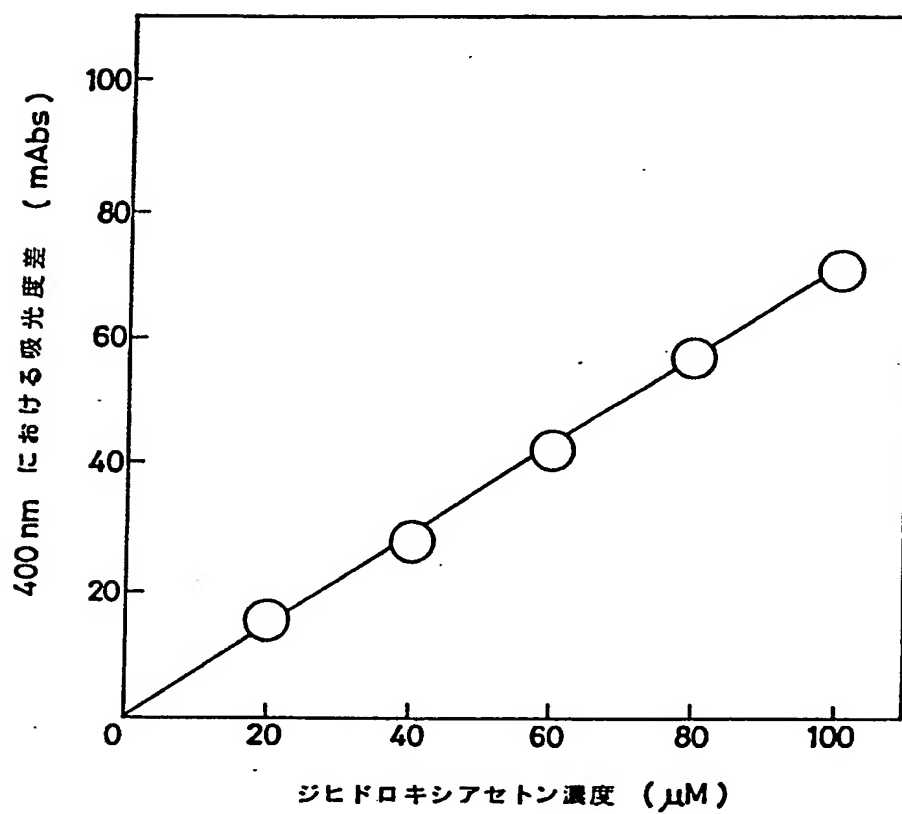
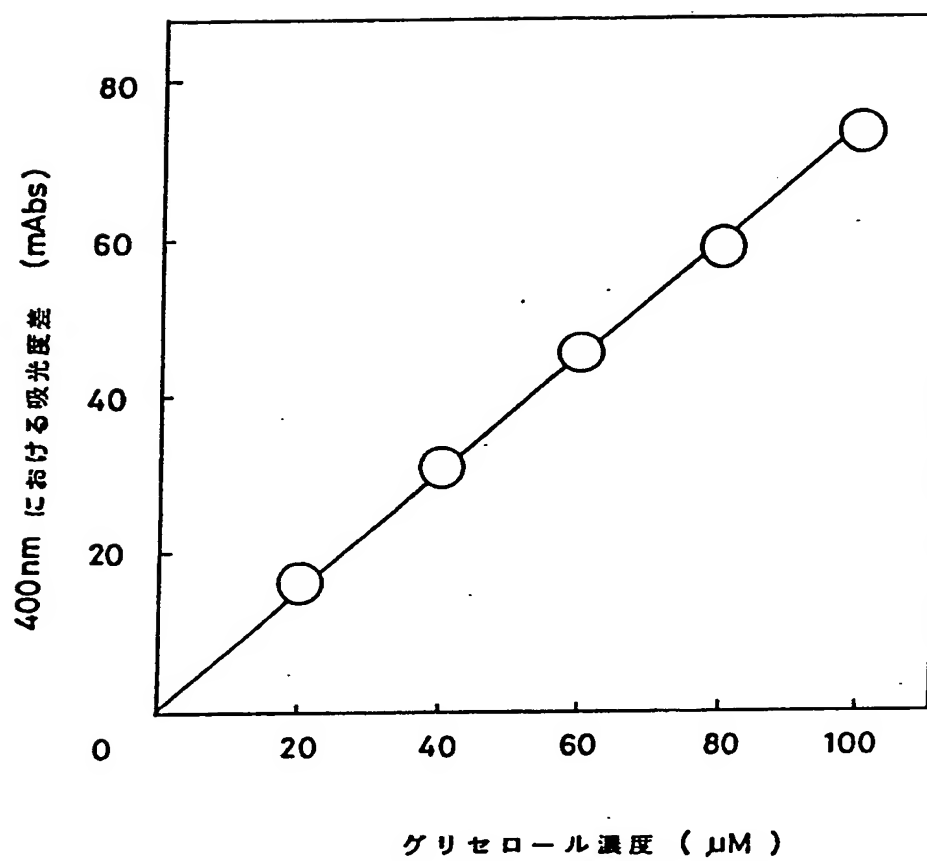


図 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP91/01786

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl ⁵ C12Q1/32		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C12Q1/32	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹		
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with Indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	Shadan Hojin Nihon Seikagaku-kai (author) "Biochemical Experiment Lecture 5 Enzyme Research (upper)", August 20, 1975 (20. 08. 75), Tokyo Kagaku Dojin p. 121-135	1-6
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
March 26, 1992 (26. 03. 92)		April 14, 1992 (14. 04. 92)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
Japanese Patent Office		

国 際 調 査 報 告

国際出願番号PCT/JP91/01786

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. C12Q1/32		
II. 国際調査を行った分野		
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料		
分 類 体 系	分 類 記 号	
IPC	C12Q1/32	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	<p>社団法人 日本生化学会編「生化学実験講座 5 酵素研究 法(上)」, 20. 8月. 1975(20. 08. 75), 東京化学同人 p. 121-135</p>	1-6
<p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の 日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出 願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解 のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新 規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の 文献との、当業者にとって自明である組合せによって進 歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
26. 03. 92	14.04.92	
国際調査機関	権限のある職員	4B 6807
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	伊 藤 明

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.